

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017782

International filing date: 30 November 2004 (30.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-114476  
Filing date: 08 April 2004 (08.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   4 月   8 日  
Date of Application:

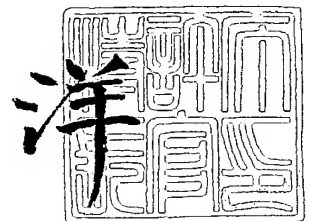
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 1 1 4 4 7 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 1 1 4 4 7 6 ]

出   願   人            東洋紡績株式会社  
Applicant(s):           国立がんセンター総長

2 0 0 5 年   1 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	CN04-0273
【提出日】	平成16年 4月 8日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	岡山県岡山市津島本町 1 8 番 2 号
【氏名】	早津 彦哉
【発明者】	
【住所又は居所】	岡山県岡山市津島中 1 丁目 3 番 1 - 1 0 4 号
【氏名】	根岸 和雄
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県松戸市五香 7 丁目 1 2 番地の 2 3 第 2 テラスジュン 1 0 5
【氏名】	白石 昌彦
【特許出願人】	
【識別番号】	000003160
【氏名又は名称】	東洋紡績株式会社
【代表者】	津村 準二
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	000619
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

亜硫酸濃度が 6.2 M を超えることを特徴とする試薬組成物。

**【請求項 2】**

亜硫酸濃度が 6.2 M を超える濃度から 10 M であることを特徴とする請求項 1 記載の試薬組成物。

**【請求項 3】**

亜硫酸塩がアンモニウム塩とナトリウム塩の混合物であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の亜硫酸塩試薬組成物。

**【請求項 4】**

亜硫酸アンモニウム、亜硫酸水素アンモニウム及び亜硫酸水素ナトリウムの混合物であることを特徴とする請求項 3 に記載の試薬組成物。

**【請求項 5】**

pH が 5.0 から 5.6 である請求項 1 から 4 に記載の試薬組成物。

**【請求項 6】**

試料 DNA 中の核酸を脱アミノ化する方法であって、下記工程、(a) 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に変性させる工程 (1 本鎖 DNA の場合はこの工程はスキップできる)、(b) (a) の試料を酸性条件下、亜硫酸濃度が 5 M を超える濃度条件化で処理する工程 (c) アルカリで処理する工程：を含むことを特徴とする核酸の脱アミノ化方法。

**【請求項 7】**

脱アミノ化する核酸がシトシンである、請求項 6 の脱アミノ化方法。

**【請求項 8】**

工程 (b) の亜硫酸濃度が 6 M から 10 M であること特徴とする請求項 6 記載の核酸の脱アミノ化方法。

**【請求項 9】**

工程 (b) の pH が 5.0 から 5.6 である請求項 6 記載の核酸の脱アミノ化方法。

**【請求項 10】**

工程 (b) の処理温度が 70℃ 以上で、処理時間が 1 時間未満であることを特徴とする請求項 6 から 9 記載の核酸の脱アミノ化方法。

**【請求項 11】**

請求項 6 から 10 記載の方法で試料 DNA を処理した後に該試料中の 5-メチルシトシンとウラシルの存在位置を検出することを特徴とするメチル化 DNA の検出方法

**【請求項 12】**

請求項 6 から 10 記載の方法で試料 DNA を処理した後に該試料を増幅し、増幅試料中のシトシンとチミンの存在位置を検出することを特徴とする請求項 11 記載のメチル化 DNA の検出方法。

**【請求項 13】**

シトシンとチミンの存在位置の検出手段が塩基配列決定、DNA チップまたは制限酵素処理であることを特徴とする請求項 12 記載のメチル化 DNA の検出方法。

**【請求項 14】**

請求項 6 から 10 記載の方法で試料 DNA を処理し、試料 DNA 中のシトシンがウラシルに変換された場合に核酸増幅できる少なくとも 1 つのプライマー及びシトシンがウラシルに変換されない場合に核酸増幅できる少なくとも 1 つのプライマーをそれぞれ用いて該試料を増幅反応させ、増幅の有無により判定することを特徴とする請求項 11 記載のメチル化 DNA の検出方法。

**【請求項 15】**

請求項 6 の脱アミノ化方法を行うためのキットであって、1 本鎖 DNA 試料を酸性条件下、亜硫酸濃度が 5 M を超える濃度条件化で処理する工程において、処理条件を、酸性かつ亜硫酸濃度が 5 M を超える濃度に維持することが可能な試薬組成物を含む、試料 DNA 中の核酸を脱アミノ化するためのキット。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 1 のメチル化 DNA の検出方法を行うためのキットであって、1 本鎖 DNA 試料を酸性条件下、亜硫酸濃度が 5 M を超える濃度条件化で処理する工程において、処理条件を、酸性かつ亜硫酸濃度が 5 M を超える濃度に維持することが可能な試薬組成物を含む、メチル化 DNA の検出方法を行うためのキット。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】核酸の脱アミノ化試薬組成物およびメチル化DNAの検出方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸の脱アミノ化方法、および、該方法を含む試料DNA中のメチル化DNAの検出方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

真核生物のゲノムはメチル化されることによって遺伝子の発現が制御されることが知られている。このため、遺伝情報としてメチル化DNAを同定することは非常に重要である。中でも、5-メチルシトシンは真核生物のゲノムにおいてもっとも頻繁に修飾された塩基であり、その異常により先天疾患やガンが起こることが知られている。しかし5-メチルシトシンはシトシンと同じ塩基配列を示すため、そのままでは配列決定やPCRによって同定できない。

## 【0003】

この問題を解決する手段としてもっとも良く使われる方法は、ゲノムDNAを亜硫酸塩と反応させシトシンを脱アミノ化し、その後のアルカリ加水分解によりウラシルに変化させる方法である（ウラシルはその後の塩基対挙動においてチミンに対応する）。5-メチルシトシンはこのような条件下では変化しない（例えば、非特許文献1を参照。）。したがってこのような処理を行ったのちに塩基配列決定を行うと、5-メチルシトシンの位置だけがシトシンと判定され5-メチルシトシンの位置が同定できる（例えば、非特許文献2を参照。）。

【非特許文献1】Hayatsuら、Biochemistry、VOL. 9、P2858-2865（1970）

【非特許文献2】Formmerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、VOL89、P1827-1831（1992）

## 【0004】

DNAの亜硫酸塩処理条件は4.9Mの亜硫酸水素ナトリウム溶液（pH5）中で、50℃、12時間から16時間反応させることが一般的である（例えば、非特許文献3を参照。）。このことが5-メチルシトシンの同定が迅速に行えない原因の1つとなっており、迅速な反応方法の開発が望まれていた。

【非特許文献3】EadsらMethods in Molecular Biology、VOL200、P71-85（2002）

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の課題は、核酸の脱アミノ化反応を迅速化し、短時間でDNA中のメチル化DNAの検出を可能にすることである。すなわち、シトシンの脱アミノ化反応を迅速化し、短時間でDNA中のメチル化シトシンの検出を可能にすることである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者らは上記課題を解決するため、鋭意研究した結果、種類の異なる亜硫酸塩を混合することにより、高濃度の亜硫酸塩溶液が調製できること及びDNAを高濃度亜硫酸塩と反応させることにより、極めて短時間でシトシンの脱アミノ化反応が進むことを見出し、本発明を完成するに至った。即ち本発明は（1）高濃度の亜硫酸塩試薬組成物。（2）DNAを高濃度の亜硫酸塩溶液と反応させる迅速なシトシンの脱アミノ化方法。（3）DNAを高濃度の亜硫酸塩溶液と反応させた後に該試料中の5-メチルシトシンとウラシルの存在位置を検出することを特徴とするメチル化DNAの検出方法である。

## 【発明の効果】

## 【0007】

本発明による高濃度の亜硫酸塩試薬組成物を用いてDNAの脱アミノ化反応を行うことにより、脱アミノ化反応が短時間で済み、迅速にメチル化DNAの検出ができる利点がある。更に反応が短時間であるため、DNAの分解を防ぐために使用されるヒドロキノンが必要とせず、DNAの分解（損傷）が少ない利点がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の実施形態の一つは、高濃度の亜硫酸塩試薬組成物である。

【0009】

本発明で述べる亜硫酸とは化学式で言えば、 $\text{H}_2\text{SO}_3$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{--}$ などを意味する。本発明の好ましい形態である酸性条件下では、ほとんどが重亜硫酸イオン（ $\text{HSO}_3^-$ ）として存在する。

【0010】

本発明の高濃度の亜硫酸塩試薬組成物の亜硫酸濃度は、低すぎると脱アミノ化反応速度が低下する傾向がある。したがって、好ましくは6.2 M以上、さらに好ましくは8 M以上である。一方濃度が高すぎると結晶が析出しやすい。したがって、好ましくは10 M以下である。

本発明の高濃度の亜硫酸塩試薬組成物のpHは、脱アミノ化反応の最適pHとほぼ同一であることが好ましい。脱アミノ化反応は亜硫酸濃度が高いほど速く進行する傾向があり、そのため、試料核酸と高濃度亜硫酸試薬以外不要な溶液を入れることはできるだけ避けることが好ましい。したがって、最も好ましくは、亜硫酸濃度8 Mから10 MかつpH 5.0から5.6の場合である。

【0011】

このような高濃度の亜硫酸塩試薬組成物は、種類の異なる亜硫酸塩を混合することにより調製することができる。

混合する亜硫酸塩種としては、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸アンモニウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸カリウムなどがあり、中でも溶解度及び調製後のpHの理由により、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウムの組み合わせが好ましい。調製法は亜硫酸水素アンモニウム溶液（本溶液は溶液の形態でしか市販されていない）に亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸アンモニウムの粉末を添加し、70℃で5分から10分加温することが好ましい。このようにして、単一の亜硫酸塩ではなし得なかった濃度の亜硫酸塩試薬組成物を得ることができる。

【0012】

本発明の実施形態の一つは、核酸の脱アミノ化方法である。

核酸の脱アミノ化は、1本鎖核酸を酸性条件下、高濃度の亜硫酸濃度条件下で処理し、さらにアルカリで処理する工程を含む。試料が2本鎖DNAの場合は変性により1本鎖に変える工程をさらに含む。

この方法において、1本鎖核酸を酸性条件下、高濃度の亜硫酸濃度条件下で処理する工程において、上記の本発明の高濃度の亜硫酸塩試薬組成物を用いてもよい。

【0013】

本発明のDNAの脱アミノ化反応条件は亜硫酸塩濃度は7 M以上、pHが5.0から5.6が好ましい。亜硫酸濃度が低いと脱アミノ化反応速度が低下する。またpHが低すぎても、高すぎても脱アミノ化率が低下する。

反応温度は70℃から90℃で10分から20分間処理することが好ましい。反応時間が短すぎるとシトシンの脱アミノ化が不十分になり、長すぎると核酸の分解等の損傷が起こる。

【0014】

本発明の実施形態の一つは、上記脱アミノ化反応後の核酸からメチル化DNAを検出する方法である。

好ましい事例としては、シトシンの脱アミノ化反応を迅速化し、短時間でDNA中のメチ

ル化シトシンの検出を可能にすることである。

本発明において使用される脱アミノ化反応後のメチル化DNAの検出にはPCR後、塩基配列決定によりシトシンとチミンの存在位置を検出する方法、シトシンがチミンに変化した場合にサンプルとハイブリダイゼーションするプローブとシトシンがチミンに変化しない場合にハイブリダイゼーションするプローブをそれぞれ固定化したDNAチップを用いる方法、シトシンがチミンに変化することにより、DNAを切断する乃至は切断しなくなる制限酵素を用いてDNAの切断の有無で判定する方法、試料DNA中のシトシンがウラシルに変換された場合に核酸増幅できる少なくとも1つのプライマー及びシトシンがウラシルに変換されない場合に核酸増幅できる少なくとも1つのプライマーをそれぞれ用いて該試料を増幅反応させ、増幅の有無により判定するなどの方法を用いることができる。PCRを介することが好ましいが、特に限定されるものではない。

#### 【実施例】

##### 【0015】

本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

##### 【実施例1】（亜硫酸濃度の測定。）

亜硫酸濃度の測定には塩酸溶液中で亜硫酸塩から2酸化硫黄が生成し、生成した2酸化硫黄の量に依存して、276 nmの吸光度 ( $A_{276}$ ) が変化することを利用した。吸光度測定用のキュベット (1 x 1 x 4 cm、日立社製) に3 mlの0.1 N塩酸 (和光純薬社製) をいれておく。蒸留水にて希釈した試料30  $\mu$  lをキュベットにくわえてパラフィルムでふたをして3回転倒攪拌したのちに分光光度計 (日立社製、モデルU-2800) で276 nmの吸光度を測定した。0.2 mMから3 mMに希釈した亜硫酸ナトリウム (和光純薬社製) 溶液を標準液として同様に吸光度を測定した。標準液と試料の吸光度値から試料の亜硫酸濃度を算出した。この方法にて市販の50%亜硫酸水素アンモニウム (和光純薬社製) の亜硫酸濃度を測定したところ、6.0 Mから6.2 Mであった。

##### 【0016】

##### 【実施例2】（溶解度の測定）

亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸アンモニウム1水和物 (いずれも和光純薬社製) の溶解度を測定した。30℃及び70℃にて10 mlの蒸留水に各試薬を溶解しなくなるまで添加してその時の質量、体積及びpHを測定した。また実施例1記載の方法にて亜硫酸濃度の定量を行った。表1にその結果を示す。表中、計算値とは溶解した各亜硫酸塩の質量と分子量から計算した値であり、定量値とは実施例1記載の方法で測定した値である。70℃での溶解度は亜硫酸水素ナトリウムで5.9 M、亜硫酸ナトリウムで2.1 M、亜硫酸アンモニウム1水和物で4.3 Mであった。

##### 【0017】

##### 【表1】

試薬	温度	濃度			pH
		g/ml	M		
			計算値	測定値	
亜硫酸水素ナトリウム	30℃	0.49	5.2	5.0	4.4
	70℃	0.61	6.5	5.9	4.5
亜硫酸ナトリウム	30℃	0.20	1.6	1.5	10.3
	70℃	0.26	2.1	2.1	10.5
亜硫酸アンモニウム 1水和物	30℃	0.51	3.5	3.5	8.5
	70℃	0.67	4.6	4.3	8.2



## 【0018】

[実施例3] (高濃度亜硫酸塩溶液の調製)

5. 0 ml の亜硫酸水素アンモニウム溶液に 2. 08 g の亜硫酸水素ナトリウム及び 0. 67 g の亜硫酸アンモニウムを加えて 70℃ で 5 分間攪拌、溶解した。このときの pH は 5. 4 であった。これにより 10 M の亜硫酸塩溶液がえられた。この溶液の pH 及び亜硫酸濃度は 70℃、4 時間でも変化なかった。

## 【0019】

[実施例4] (亜硫酸塩処理による 2'-デオキシシチジン及び 5-メチル 2'-デオキシシチジンの脱アミノ化反応速度)

脱アミノ化反応物の定量は非特許文献 4 記載の方法に従った。2'-デオキシシチジン及び 5-メチル 2'-デオキシシチジン (シグマ社製) を蒸留水にて 0. 2 M になるように溶解した。2'-デオキシシチジン溶液 25  $\mu$  l に実施例 1 で調製した 5. 9 M の亜硫酸水素ナトリウム溶液 (反応終濃度は  $5. 9 \times 250 \div (250 + 25) \approx 5. 3$  M になる) 又は実施例 3 で調製した 10 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液 (反応終濃度は  $10. 0 \times 250 \div (250 + 25) \approx 9. 0$  M になる) をそれぞれ 250  $\mu$  l 加えて 0 から 10 分間処理し、500  $\mu$  l の冷水を加えて反応を停止した。75  $\mu$  l の反応液を 5 ml の 0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7. 2) と混合して室温で 40 分放置した後分光光度計 (日立社製、モデル U-2800) にて 270 nm の吸光度を測定した。未反応試料の吸光度は 0. 8 であった。9 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液のみの吸光度は 0. 05 であった。未反応試料の吸光度を 100% とし、反応試料の吸光度の減少から脱アミノ化反応産物を定量した。5-メチル 2'-デオキシシチジンの場合は 277 nm の吸光度を測定した。

【非特許文献 4】Sonoら、J. Am. Chem. Soc.、VOL 96、P 4745-4749 (1973)

## 【0020】

図 1 に脱アミノ化反応の結果を示した。70℃、pH 5. 4 でのデオキシシチジンの半減期 ( $t_{1/2}$ ) は 5. 3 M の亜硫酸水素ナトリウム溶液中で 3 分、9. 0 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液中で 1. 8 分であった。5. 3 M のデオキシシチジンの半減期 / 9. 0 M のデオキシシチジン半減期は 1. 7 であり、これは濃度比 (9. 0 / 5. 3) と一致する。すなわち脱アミノ化反応速度が亜硫酸塩の濃度に依存することを示していた。また 10 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液を段階希釈して 2 M から 9 M の濃度で反応させて脱アミノ化反応処理を行ったところ、脱アミノ化反応が亜硫酸塩濃度依存的であることが示された。5-メチル 2'-デオキシシチジンの 9. 0 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液中での脱アミノ化率は 70℃、10 分間で 16%、90℃、10 分間で 23% であった。

## 【0021】

[実施例5] (脱アミノ化反応の温度依存性)

実施例 4 記載の方法にて 9. 0 M 亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液 (pH 5. 4) 中、90℃、50℃、37℃でのデオキシシチジンの半減期を測定したところ、それぞれ 1 分以下、5 分及び 17 分であった。

## 【0022】

[実施例6] (100%脱アミノ化時間の測定)

2'-デオキシシチジンが完全に 2'-デオキウリジンに変換する時間を測定した。0. 2 M 2'-デオキシシチジン溶液 25  $\mu$  l に実施例 3 で調製した 10 M の亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液 (反応終濃度は 9. 0 M になる) を 250  $\mu$  l 加えて種々の時間処理した後アルカリ処理して脱アミノ化反応物を 2'-デオキウリジンに変換した。サンプル 10  $\mu$  l を以下に示す HPLC 分析に供して 2'-デオキシシチジンと 2'-デオキウリジンを測定した。

## 【0023】

HPLC 分析システム (日立社製) にウルTRASフェアー ODS 4. 6 mm X 25

c mカラム (ベックマン-コールター社製) を接続した。緩衝液A (100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0))、及び緩衝液B (90%メタノール、1 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)) を調製した。HPLCシステムのプログラムは流速0.7 ml/分、緩衝液濃度プロファイル100%A:0分、100%A:5分、85%A:25分、55%A:35分、0%A:60分とした。この条件での2'-デオキシシチジンの溶出時間は19分、2'-デオキウリジンは22分、5-メチル-2'-デオキシシチジンは25分、2'-デオキシグアノシンで26分、チミジンは28分、2'-デオキシアデノシンは32分であった。濃度はチャート面積から算出した。

#### 【0024】

9.0 M亜硫酸水素ナトリウム-アンモニウム溶液 (pH 5.4) 処理で2'-デオキシシチジンが100%2'-デオキウリジンに変換する時間は70℃で30分、90℃で8分であった。

#### 【0025】

[実施例7] (脱アミノ化反応のpH依存性)

50%亜硫酸水素アンモニウム溶液に任意の割合の亜硫酸水素ナトリウムと亜硫酸ナトリウムを溶解させ、pH 4.0から6.0の7 M亜硫酸塩溶液を調製した。この溶液を用いて実施例4記載の方法にて2'-デオキシシチジンの脱アミノ化率を測定した。反応時間は5分、温度は60℃で処理した。図2に示したように至適pHは5.0から5.6であった。

#### 【0026】

[実施例8] (ゲノムDNAの脱アミノ化反応)

サケ睾丸DNA (シグマ社製) を1.6 mg/mlになるように滅菌水で溶解した。この溶液50  $\mu$  lに3 N水酸化ナトリウム (和光純薬社製) を5  $\mu$  l加えて30℃、30分間処理して2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性した。次ぎに550  $\mu$  lの10 Mアンモニウム-ナトリウム亜硫酸溶液 (pH 5.4) を加えて良く混合後90℃、10分間反応した (亜硫酸塩の終濃度は9 Mになる)。反応液をTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8)、1 mM EDTA) で緩衝化したセファデックス G-50カラム ( $\phi$  15 x 40 mm、バイオラッドエコノパック10、バイオラッド社製) にアプライし、脱塩操作を行った。UVモニタリングによりDNA画分を回収し、2.5倍容の冷エタノール (和光純薬社製)、1/10容の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えてDNAを沈澱させた。遠心操作によって沈澱したDNAを分離、回収後100  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。90  $\mu$  lのサンプルに11  $\mu$  lの2 N水酸化ナトリウムを添加して10分間処理してDNA中のシトシン脱アミノ化しウラシルに変換させた。

#### 【0027】

上記処理液に30  $\mu$  lの3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2)、70  $\mu$  lの滅菌水及び500  $\mu$  lの冷エタノール (和光純薬社製) を加えて-20℃、1時間放置した。沈澱したDNAを回収して40  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。30  $\mu$  lのDNA溶液に1.5  $\mu$  lの反応緩衝液 (0.1 M塩化マグネシウム、0.2 M Tris-HCl (pH 8))、10  $\mu$  gのDNase I (ロシュ社製) を加えて37℃、2時間処理した後、0.4ユニットのヘビ毒フォスフォジエステラーゼ (Worthington社製) を追加し、さらに90分間反応させた。次いで0.2ユニットのフォスフォジエステラーゼと2ユニットのアルカリフォスファターゼ (プロメガ社製) を添加して90分間処理することによってDNAをヌクレオシドに分解した。分解反応物をエタノール沈澱操作によって蛋白質や未反応物と分離して溶液を吸引乾燥した。30  $\mu$  lの滅菌水に溶解後、実施例6記載のHPLC分析でヌクレオシド量を測定した。

#### 【0028】

図3にHPLC分析のチャートを、表2に各ヌクレオシドの比率を示した。9 Mのアンモニウム-ナトリウム亜硫酸溶液中、90℃、10分間処理した時のゲノムDNA中のシトシンの脱アミノ化率 (シトシンからウリジンへの変換率) は99.6%であった。また5-メチルシトシンの変換率は10%以下であった。さらに他の塩基の変換は認められな

かった。70℃及び37℃で同様の脱アミノ化率が得られる反応時間は、それぞれ16分と170分であった。

【0029】

【表2】

	Mol %					
	C	U	mC	G	T	A
亜硫酸処理	0.08	19.89	1.29	21.56	29.28	27.90
未処理	20.26	0.04	1.41	22.43	28.67	27.19

表2中

C: 2'-デオキシシチジン、U: 2'-デオキウリジン、mC: 5-メチル-2'-デオキシシチジン、G: 2'-デオキシグアノシン、T: チミジン、A: 2'-デオキシアデノシン

【0030】

【実施例9】(脱アミノ化処理DNAのPCR増幅)

1  $\mu$ gの制限酵素ScaI (NEB社製)で処理したpUC119 (タカラバイオ社製)を50  $\mu$ lの0.3N水酸化ナトリウム溶液中で37℃、30分間処理して1本鎖DNAに変性した。処理液を70℃または90℃で3分間加熱した後に500  $\mu$ lの10Mアンモニウム-ナトリウム亜硫酸溶液(pH 5.4)を加えて良く混合してミネラルオイルを重層し、70℃または90℃で5分から40分間反応させた。反応液130  $\mu$ lを抜き取り、氷冷した滅菌水と混合した。取扱い説明書にしたがって、Wizard DNA Clean-Upシステム(プロメガ社製)を用いてDNAを精製し、90  $\mu$ lの滅菌水に溶解した。11  $\mu$ lの2N水酸化ナトリウム溶液を添加して37℃、10分間処理した。10  $\mu$ gの酵母tRNA (シグマ社製)をキャリアーとしてエタノール沈澱操作によりDNAを回収し、100  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mMEDTA)に溶解した。

【0031】

この溶液1  $\mu$ lをサンプルとして、2種類のプライマー(配列、5'-CGGAATTCTATTGGTTAAAAAATGAG-3' 及び5'-AACTGCAGACATTAACCTATAAAAAATA-3')、AmpliTaq DNAポリメラーゼ(アプライドバイオシステム社製)を用いて50  $\mu$ lの反応系でPCRを行った。サイクル条件は95℃、3分後95℃、30秒→57℃、30秒→70℃、3分を30サイクルで行い、その他の条件は取扱い説明書にしたがった。PCR後1  $\mu$ lのサンプルをアガロースゲル電気泳動で分析し、増幅量を確認した。

【0032】

その結果、未処理のDNAと70℃または90℃で5分から40分間処理したサンプルのPCRによるDNAの増幅量はほぼ同じであった。このことは亜硫酸処理したDNAが切断などの損傷を受けていないことを示している。さらに70℃、20分処理したサンプルと90℃、10分処理したサンプルのPCR産物をBigDye™ Terminator Cycle Sequencingキット(アプライドバイオシステム社製)、ABIモデル3700オートシーケンサー(アプライドバイオシステム社製)を用いて塩基配列決定を行ったところ、シトシンがチミンに変化していた。

## 【0033】

実施例 1～9 により明らかなように、本発明によれば短時間で DNA の脱アミノ化反応が行える。さらに迅速なメチル化 DNA の検出を可能にする。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0034】

本発明の高濃度亜硫酸塩試薬は短時間で DNA の脱アミノ化反応を行うことができ、メチル DNA の迅速な検出が可能になり、ガンや遺伝子疾患の診断等医療分野に寄与することが大である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

【図 1】 本発明の亜硫酸塩処理反応における脱アミノ化率をシトシンの残存量で示したものである。

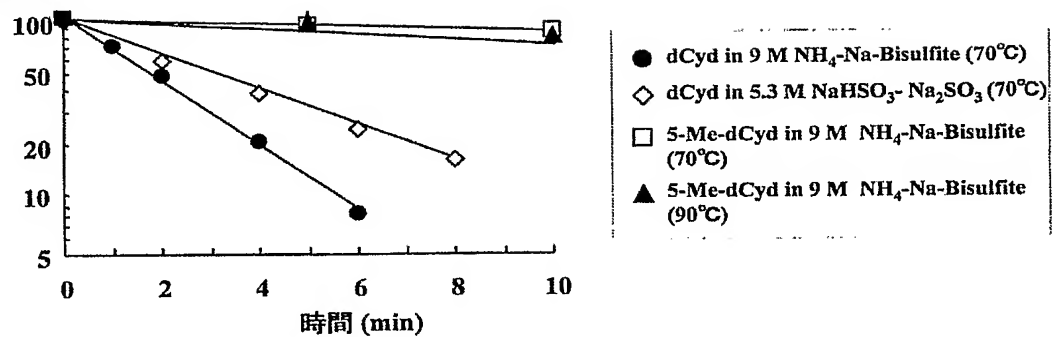
【図 2】 本発明の脱アミノ化反応の pH 依存性を示したものである。

【図 3】 本発明の脱アミノ化方法にて処理したサケ睾丸 DNA の HPLC 分析結果である。

【書類名】 図面

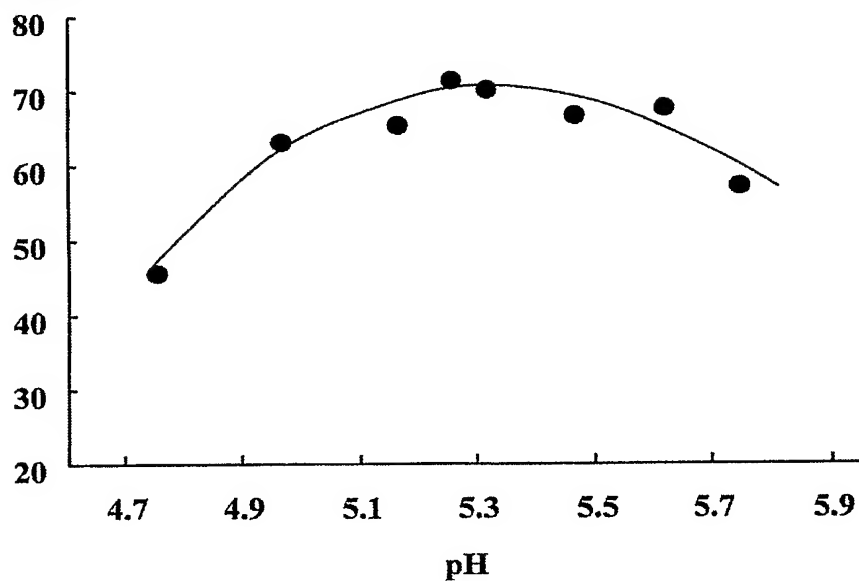
【図 1】

% 未反応物

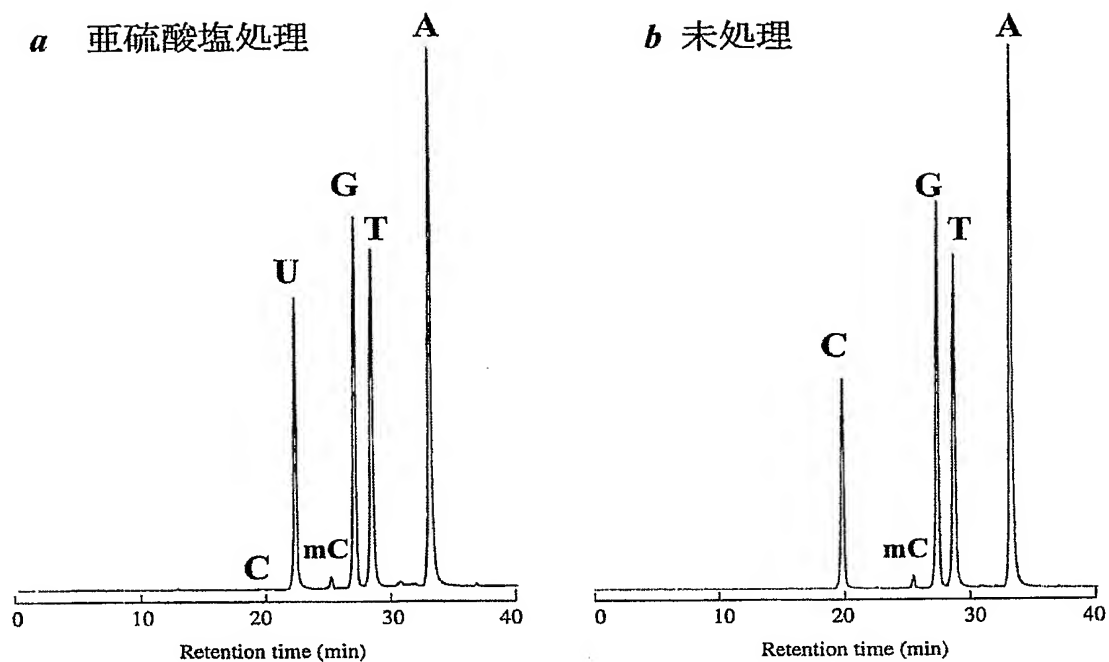


【図 2】

% 脱アミノ化物



【図 3】



C : 2'-デオキシシチジン  
U : 2'-デオキウリジン  
mC : 5-メチル-2'-デオキシシチジン  
G : 2'-デオキシグアノシン  
T : チミジン  
A : 2'-デオキシアデノシン

## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】核酸の脱アミノ化反応を迅速化し、短時間でDNA中のメチル化DNAの検出を可能にすること、すなわち、シトシンの脱アミノ化反応を迅速化し、短時間でDNA中のメチル化シトシンの検出を可能にすること。

【解決手段】（１）高濃度の亜硫酸塩試薬組成物。（２）DNAを高濃度の亜硫酸塩溶液と反応させる迅速なシトシンの脱アミノ化方法。（３）DNAを高濃度の亜硫酸塩溶液と反応させた後に該試料中の５－メチルシトシンとウラシルの存在位置を検出することを特徴とするメチル化DNAの検出方法を提供する。

【書類名】 出願人名義変更届  
【提出日】 平成16年 8月30日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2004-114476  
【承継人】  
【識別番号】 590001452  
【氏名又は名称】 国立がんセンター総長  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100065215  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三枝 英二  
【電話番号】 06-6203-0941  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 001616  
【納付金額】 4,200円



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-114476
受付番号	50401457788
書類名	出願人名義変更届
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成 16 年 10 月 5 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	590001452
【住所又は居所】	東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号
【氏名又は名称】	国立がんセンター総長

## 【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100065215
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜 TNKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	三枝 英二

特願 2 0 0 4 - 1 1 4 4 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 1 6 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

東洋紡績株式会社

特願 2 0 0 4 - 1 1 4 4 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 0 0 0 1 4 5 2 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 1 2 月 1 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号

氏 名

国立がんセンター総長